

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-264847

(P2000-264847A)

(43) 公開日 平成12年9月26日 (2000. 9. 26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ページ* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
31/661		31/661	4 C 0 8 6
A 6 1 P 27/02		A 6 1 P 27/02	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2000-3087(P2000-3087)
(22) 出願日 平成12年1月12日 (2000. 1. 12)
(31) 優先権主張番号 特願平11-5420
(32) 優先日 平成11年1月12日 (1999. 1. 12)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 599009499
西田 輝夫
山口県宇部市大字西岐波396番地の2
(71) 出願人 00017/634
参天製薬株式会社
大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号
(72) 発明者 西田 輝夫
山口県宇部市大字西岐波396番地の2
(72) 発明者 中田 勝彦
奈良県桜井市大字箸中531番地の1
(74) 代理人 100060874
弁理士 岸本 瑛之助 (外4名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 角膜障害治療剤

(57) 【要約】

【課題】 R h o 活性化作用を有する化合物の角膜障害に対する作用、特に角膜上皮伸展に対する作用を調べ、R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤を提供する。

【解決手段】 本発明は、R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤、たとえば角膜上皮伸展促進剤である。R h o 活性化作用を有する化合物は、たとえばリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体である。角膜障害は、たとえば角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Rho活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤。

【請求項2】 Rho活性化作用を有する化合物がリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体である請求項1記載の角膜障害治療剤。

【請求項3】 リゾホスファチジン酸のアシル誘導体がオレオイルリゾホスファチジン酸である請求項2記載の角膜障害治療剤。

【請求項4】 角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである請求項1から請求項3のいずれかに記載の角膜障害治療剤。

【請求項5】 Rho活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体等のRho活性化作用を有する化合物を有効成分とした、角膜上皮伸展の促進作用を有する角膜障害治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】角膜は直径約1cm、厚さ約1mmの透明な無血管の組織である。角膜の透明性は視機能に重要な影響を与えており、角膜における種々の生理生化学的現象は、主として角膜の透明性の維持ということを目的として機能している。

【0003】角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の種々の疾患により引き起こされた角膜上皮欠損は、混合感染の併発がなければ自然に修復する。しかし、何らかの理由で修復が遅延したりあるいは修復が行われずに上皮欠損が遷延化すると、上皮の正常な構築に悪影響を与えるのみならず、実質や内皮の構造や機能まで害される。従来からの治療法の原理は、外界の刺激から角膜表面を保護することにより自然に上皮が伸展して欠損部の再被覆をはかるという受動的なものである。近年、細胞生物学の発展に伴い、細胞の分裂・移動・接着・伸展等に関与する因子が解明されており、角膜上皮欠損の修復には、角膜上皮の伸展を促進する化合物が重要な役割を担うことが報告されている（臨眼，46，738-743（1992）、眼科手術，5，719-727（1992））。

【0004】ところで、細胞は外界シグナルにตอบสนองして、細胞骨格や細胞接着装置をダイナミックに変化させて外界環境に適応させる。細胞骨格を形成する主要構成成分は、アクチン等からなるマイクロフィラメント、チューブリン等からなる微小管、ケラチン等からなる中間径フィラメントの3種類の線維構造である。これらは互いに密接に関係しながら、細胞接着、細胞形態、細胞質分裂、細胞の極性形成等の高次機能を担っている。

【0005】このうち、アクチン-マイクロフィラメント系の細胞骨格を制御していると考えられているのが、

低分子量GTP結合タンパクのサブファミリーの1つであるRhoファミリーである。Rhoファミリーは、Rho、Rac、Cdc42等のメンバーから構成されており、細胞増殖因子等の細胞外シグナルの下流で作用している。最近、Rhoに特異的な標的タンパクが同定され、細胞骨格と接着の制御機構（実験医学，16，1782-1788（1998））や細胞運動の制御機構（実験医学，16，2032-2039（1998））等、細胞現象の制御メカニズムが明らかにされつつある。

【0006】一方、Rhoを特異的に活性化させる化合物としてリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体が知られている（Cell，70，389-399（1992））。リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体についてはさまざまな作用が報告されている。例えば、細胞とフィブロネクチンの結合を促進して細胞形態を調節すること（J. Cell Biol.，127，1447-1459（1994））、皮膚創傷時におけるフィブロネクチンの上皮細胞および内皮細胞への結合を促進すること（アメリカ特許5480877号明細書）、グリコサミノグリカン産生促進作用を有する皮膚活性化剤であり、化粧品および皮膚老化防止外用剤として有用であること（国際特許公開WO95/35090号公報）、乾癬などで生じる上皮細胞の過増殖を抑制すること（アメリカ特許5565439号明細書）、マクロファージを活性化し腫瘍における細胞壊死を抑制すること（アメリカ特許5149527号明細書）、アポトーシスを阻害し細胞の機能を維持または回復すること（国際特許公開WO98/41213号公報）等がある。

【0007】眼科領域においては、網膜色素上皮細胞の増殖を促進すること（Curr. Eye Res.，16，698-702（1997））、培養水晶体上皮細胞においてCa²⁺イオンの流入を促進すること（Cell. Signal.，9，609-616（1997））、角膜障害時に房水中のリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の量が増加することおよび正常な角膜実質細胞の増殖を促進すること（Am. J. Physiol.，274，C1065-C1074（1998））等が報告されている。

【0008】しかしながら、Rhoと角膜上皮細胞との関係については報告されておらず、角膜上皮欠損の修復と深い関係がある角膜上皮の移動機構に対するRho活性化作用を有する化合物の効果は無論知られていない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、細胞現象の制御メカニズムに関与する低分子量GTP結合タンパクであるRhoの角膜上皮の移動機構への関与の研究を通じて、Rho活性化作用を有する化合物の角膜障害に対する作用、特に角膜上皮伸展に対する作用を調べることは非常に興味ある課題であった。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者等はRhoの角膜上皮の移動機構への関与を検討するために、まずRho

○阻害剤の角膜上皮に及ぼす影響を検討した。その結果、Rh○阻害剤によって角膜上皮の伸展は完全に抑制され、角膜上皮の移動機構には低分子量GTP結合タンパクであるRh○による細胞内骨格系タンパクの制御が関与していることが明らかとなった。

【0011】次に、Rh○活性化作用を有する化合物の角膜上皮に対する効果を検討したところ、優れた角膜上皮伸展に対する促進作用を有することを見いだした。

【0012】さらに、Rh○活性化作用を有する化合物とRh○阻害剤を併用したところ、上記の角膜上皮伸展の促進はほぼ完全に抑制され、角膜上皮伸展に対する促進作用は、Rh○活性化作用に基づくものであることが確認された。

【0013】以上のことから、Rh○活性化作用を有する化合物が優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが明らかとなった。

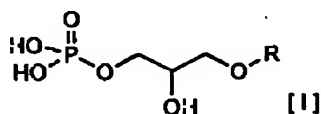
【0014】

【発明の実施の形態】本発明におけるRh○活性化作用を有する化合物とは、Rh○が関与している細胞現象の制御メカニズムを亢進させる化合物を示す。

【0015】本発明におけるリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体とは下記一般式〔I〕で表わされる化合物を示す。

【0016】

〔化1〕



【0017】〔式中、Rは水素原子またはアシル基を示す。〕

本発明におけるアシル基とは、飽和もしくは不飽和の脂肪族カルボニル基または芳香族カルボニル基を示すが、好ましくは飽和もしくは不飽和の脂肪族カルボニル基で、より好ましくは炭素数6以上的高级脂肪族カルボニル基で、特に好ましい例はオレオイル基およびステアロイル基である。

【0018】本発明における角膜障害とは、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等をいう。

【0019】Rh○の角膜上皮の移動機構への関与を検討すべく、Rh○阻害剤ならびにRh○活性化作用を有する化合物の角膜上皮に対する作用を検討した。詳細については後述の薬理試験の項で示すが、Rh○阻害剤として知られているボツリヌス菌の菌体外酵素であるC3酵素（以下、Exoenzyme C3とする）（Cell, 70, 389-399 (1992)）によって角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制されることを認めた。

【0020】このことから、角膜上皮の移動機構には低分子量GTP結合タンパクであるRh○が関与していることが明らかとなった。

【0021】次に、Rh○活性化作用を有する化合物の代表的な化合物であるリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の角膜上皮伸展に対する効果を検討したところ、リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体が角膜片の組織培養系における角膜上皮の伸展を促進することを見いだした。さらに、この角膜上皮伸展促進作用はExoenzyme C3によってほぼ完全に抑制されることが認められ、リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の有する角膜上皮伸展促進作用はRh○活性化作用に基づくものであることが確認された。これらのことから、Rh○活性化作用を有する化合物は、優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、角膜障害、すなわち種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等の治療に有用であることが明らかとなった。

【0022】Rh○活性化作用を有する化合物は、経口でも、非経口でも投与することができる。投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤、点眼剤等が挙げられ、特に点眼剤が好ましい。これらは汎用されている技術を用いて製剤化することができる。例えば、点眼剤は、塩化ナトリウム、濃グリセリン等の等張化剤、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等の緩衝化剤、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の界面活性剤、クエン酸ナトリウム、エドト酸ナトリウム等の安定化剤、塩化ベンザルコニウム、パラベン等の防腐剤等を必要に応じて用い調製することができる。pHは眼科製剤に許容される範囲内にあればよいが、4～8の範囲が好ましい。眼軟膏は、白色ワセリン、流動パラフィン等の汎用される基剤を用いて調製することができる。また、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤は、乳糖、結晶セルロース、デンプン、植物油等の増量剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等のコーティング剤、ゼラチン皮膜等の皮膜剤などを必要に応じて加えて調製することができる。

【0023】投与量は症状、年齢、剤型等によって適宜選択できるが、点眼剤であれば0.0001～1%（w/v）、好ましくは0.001～1%（w/v）のものを1日1～数回点眼すればよい。また、経口剤であれば通常1日当り0.1～5000mg、好ましくは1～1000mgを1回または数回に分けて投与すればよい。

【0024】以下に、製剤例および薬理試験の結果を示

すが、これらの例は本発明をよりよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0025】

【実施例】〔製剤例〕Rh α 活性化作用を有する化合物としてオレオイル リゾホスファチジン酸（以下、オレオイルLPAという）を用いた代表的な製剤例を以下に

処方例1（点眼液）

100ml中

オレオイルLPA

塩化ナトリウム

水酸化ナトリウム

塩酸

滅菌精製水

1mg

900mg

適量

適量

適量

【0028】処方例1と同様にして、必要に応じて界面活性剤や安定化剤を加えて、オレオイルLPAを100ml中5mg、10mg、50mg、100mg、50

処方例2（眼軟膏）

100g中

オレオイルLPA

白色ワセリン

流動パラフィン

100mg

90g

適量

【0030】処方例2と同様にして、オレオイルLPAを1mg、5mg、10mg、50mg含有する眼軟膏

処方例3（錠剤）

100mg中

オレオイルLPA

乳糖

トウモロコシデンプン

カルボキシメチルセルロース カルシウム

ヒドロキシプロピルセルロース

ステアリン酸 マグネシウム

10 mg

59.4mg

20 mg

6 mg

4 mg

0.6mg

【0032】上記処方の錠剤に、ヒドロキシプロピルセルロース等のコーティング剤2mgを用いてコーティングを施し、目的とするコーティング錠を得ることができる。

【0033】処方例3と同様にして、オレオイルLPAを100mg中0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、50mg含有する錠剤を得ることができる。

【0034】〔薬理試験〕

角膜上皮伸展に対する作用（in vitro）

雄性日本白色ウサギの角膜を用い、Nishida らの方法（J. Cell Biol., 97, 1653-1657 (1983)）に準じ、角膜片の組織培養系での角膜上皮伸展長を指標にして角膜上皮伸展に対する下記被験化合物の影響を検討した。

【0035】（実験方法）ウサギ角膜片より切り出した

示す。

【0026】1. 点眼剤

以下の処方の点眼剤を汎用される方法を用いて調製した。

【0027】

0mg、1000mg含有する点眼液を調製することができる。

【0029】

を調製することができる。

【0031】

角膜ブロックを、被験化合物を含む培養液（TC-199）中、37℃・5%CO₂ の条件下で24時間培養した。培養後、角膜ブロックをエタノール-氷酢酸（容積比95：5）混合液中で固定し、パラフィンで包埋して切片を作製した。切片を脱パラフィンした後、ヘマトキシリン-エオジン染色し、顕微鏡下で上皮細胞層の伸展長を測定した。

【0036】コントロールとしては被験化合物を含まない培養液で同様に培養したものを用いた。

【0037】（結果1）Rh α 阻害剤である Exoenzyme C3 を被験化合物として含む培養液で培養したときの結果を表1に示す。

【0038】

【表1】

	伸展長 (μm)
コントロール	454
Exoenzyme C3 (2 μg/ml)	186

(表中のデータは6例の平均値)

【0039】表1から判るように、Rhο阻害剤である Exoenzyme C3 を含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制され、角膜上皮伸展にRhοが関与していることが明らかとなった。

【0040】(結果2) 0.02 μM、0.2 μMおよ

び2 μMの濃度のオレオイルLPAを被験化合物として含む培養液で培養したときの結果を表2に示す。

【0041】

【表2】

	伸展長 (μm)
コントロール	454
オレオイルLPA (0.02 μM)	528
(0.2 μM)	658
(2 μM)	712

(表中のデータは6例の平均値)

【0042】表2から判るように、オレオイルLPAを含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展が濃度依存的に顕著に促進されることが認められた。

【0043】(結果3) 被験化合物として Exoenzyme C

3 をオレオイルLPAとともに培養液に添加したときの結果を表3に示す。

【0044】

【表3】

	伸展長 (μm)
コントロール	454
Exoenzyme C3 (2 μg/ml)	
+ オレオイルLPA (0.02 μM)	185
+ オレオイルLPA (0.2 μM)	182
+ オレオイルLPA (2 μM)	198

(表中のデータは6例の平均値)

【0045】表3から判るように、Rhο阻害剤である Exoenzyme C3 をオレオイルLPAとともに培養液に添加すると、角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制された。

【0046】これらのことから、角膜上皮伸展促進作用はRhοの活性化作用に基づくものであることが確認された。

【0047】

【発明の効果】上記の薬理試験から、Rhο活性化作用を有する化合物が優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、角膜上皮の創傷治癒促進作用を通じて、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが見いだされた。

フロントページの続き

(72)発明者 中村 雅胤
奈良県奈良市三松2丁目12番3-205号

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA332
4C086 AA01 AA02 DA34 NA14 ZA33

THIS PAGE BLANK (USPTO)